Reprinted from
Biochimica et Biophysica Acta
Elsevier Publishing Company
Amsterdam
Printed in The Netherlands

BBA 65234

ETUDE CINETIQUE DE L'ACTION DE LA LIPASE PANCREATIQUE SUR DES TRIGLYCERIDES EN EMULSION. ESSAI D'UNE ENZYMOLOGIE EN MILIEU HETEROGENE

G. BENZONANA ET P. DESNUELLE
Institut de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Marseille (France)

(Reçu le 22 janvier 1965)

1967

SUMMARY

The purpose of this paper was to study the action of pancreatic lipase (glycerol ester hydrolase, EC 3.1.1.3) on emulsified triglycerides. This type of action is an interesting example of an enzymatic process taking place in an heterogeneous medium. It is shown that:

1. Lipase is adsorbed by its emulsified substrate and the initial rate (v) of the reaction is a function of the number of enzyme molecules adsorbed at the interface.

2. By varying the dilution of a triglyceride emulsion in bile salts in the presence of 0.1 M NaCl, linear Lineweaver–Burk representations are obtained from which the reaction paramaters V_m and K_m can easily be derived. However, the abscissae of the representation, and consequently the K_m values, remain undefined as long as a right substitute for the substrate concentration concept is not found. Obviously, this concept cannot be used when the substrate is in an insoluble state.

3. By using two emulsions containing particles of different size, it can be shown that v does not depend directly on the weight of the insoluble substrate. For the same weight, the same amount of lipase and the same experimental conditions, v becomes higher when the average size of the particles decreases. v depends on the area (I) of the interface. I can be experimentally determined with a good accuracy by two techniques: centrifugation of the emulsions in a sucrose gradient and counting of the particles according to their size in an electronic Coulter counter.

4. On the other hand, v is inversely proportional to the total volume (A_0) of the emulsion. Thus, lipase adsorption may be considered as fully reversible in our experimental conditions and to take place according to Langmuir's isotherms. The "interface concentration" I/A_0, *i.e.* the interfacial area in a volume unit of emulsion, is playing, in the case of lipase, the role normally devoted to the concentration of the substrate. The K_m (emulsion) of lipase corresponds to a certain value of this interface concentration. This does not mean that I/A_0 is the only significant variable in the process. Other variables such as electrical charge of emulsified particles and molecular organization at the interface may also play a role.

5. It may be supposed that the well-known influence of bile salts during the intraluminar phase of triglyceride digestion is at least partly related to the ability of these substances to favour the reversibility of lipase adsorption at the interface.

UNIV. LEIDEN BIBL.

INTRODUCTION

Lorsqu'on fixe à l'avance la quantité d'enzyme et les conditions opératoires, la vitesse initiale (v) d'une réaction enzymatique augmente avec la concentration du substrat (S) jusqu'à une limite supérieure (V_m). La courbe $v = f(S)$, appelée courbe de Michaelis, affecte en général la forme d'un arc d'hyperbole équilatère dont l'asymptote est horizontale. On interprète cette forme en disant que l'enzyme adsorbe réversiblement son substrat pour donner un complexe primaire capable d'engendrer les produits de la réaction à un rythme déterminé. La vitesse est donc à tout moment proportionnelle au nombre des molécules de complexe et la courbe de Michaelis peut être assimilée à un isotherme d'adsorption. Il est intéressant de savoir jusqu'à quel point cette conception classique est applicable au cas particulier des substrats insolubles dans l'eau qui, au lieu de se disperser comme les substrats solubles au sein d'une phase homogène, se présentent sous la forme de particules plurimoléculaires séparées de l'eau par une interface.

Une première hypothèse consiste à supposer que la solubilité d'un substrat réputé insoluble n'est jamais nulle et que, même dans ce cas particulier, la réaction se déroule entièrement dans l'eau. Toutefois, l'exemple récemment étudié de la lipase pancréatique (glycerol ester hydrolase, EC 3.1.1.3)[1] montre que certains enzymes agissent au contraire de façon préférentielle sur des substrats émulsifiés. Il existe donc bien une enzymologie en milieu hétérogène dont les lois demandent à être précisées.

Ces lois, d'ailleurs, ne sont sans doute pas foncièrement différentes de celles régissant l'action d'un enzyme quelconque sur un substrat dissous. Lorsque, tous les autres facteurs étant maintenus constants, on augmente en effet les quantités d'émulsion offertes à la lipase dans un volume donné, on constate que la vitesse initiale d'hydrolyse s'accroît, puis qu'elle tend comme d'habitude vers une limite supérieure[1]. On peut alors penser[1] que l'étape primaire de la catalyse est toujours une adsorption spécifique engendrant un complexe mais, qu'au lieu d'adsorber son substrat insoluble, la lipase est adsorbée par lui. Quand la quantité de phase émulsifiée est petite, l'interface offerte est faible, la lipase est en majorité dans l'eau et l'hydrolyse est lente. En employant davantage d'émulsion, on favorise l'adsorption de la lipase. On augmente donc la vitesse jusqu'au moment où toutes les molécules de lipase se trouvent fixées à l'interface et y exercent simultanément leur action.

Le but du présent travail est de vérifier la validité de cette hypothèse et d'en préciser la signification sur le plan quantitatif.

TECHNIQUES

Purification de la lipase

Les préparations sont purifiées en soumettant des extraits de pancréas de porc à une série de précipitations fractionnées dans $(NH_4)_2SO_4$ et l'acétone ainsi qu'à une chromatographie sur DEAE-cellulose[2]. Les fractions actives fournies par la chromatographie ne sont pas dialysées car la quantité de sels qu'elles apportent est négligeable. Elles peuvent être conservées à $-20°$ durant plusieurs mois sans baisse sensible d'activité. Leur activité spécifique est à peu près 4000 (teneur en lipase, 60% environ).

Mesure des activités (Nombre d'unités-lipase)

Pour déterminer la teneur globale en lipase d'une préparation, on utilise le test quantitatif déjà maintes fois décrit consistant à titrer de façon continue les acides libérés par l'enzyme au sein d'une émulsion de triglycérides dans la gomme arabique. Excellent pour des mesures de routine réalisées dans des conditions standard, ce test se prête cependant mal aux études cinétiques précises sur lesquelles le présent travail est fondé. D'autres émulsions dans les sels biliaires* ont été réalisées. On en trouvera la préparation dans le paragraphe suivant. Leur caractéristique essentielle est de donner en toutes circonstances des représentations de Lineweaver–Burk et des cinétiques rectilignes. Elles permettent également d'évaluer avec une bonne précision l'aire de l'interface séparant la phase grasse de la phase aqueuse. Au moment des mesures, un volume donné de l'émulsion-stock est ajouté à une solution contenant du désoxycholate de sodium**, NaCl et $CaCl_2$ (concentrations finales respectives: $4.47 \cdot 10^{-3}$ M, 10^{-1} M et $0.5 \cdot 10^{-3}$ M). Le volume final est généralement 40 ml. Les mélanges sont placés dans des béchers comportant une arrivée d'azote dépourvu de CO_2 et plongés dans un thermostat à 37°. Le pH est amené à 9.0 par addition de soude 0.1 N. La libération d'acide est enregistrée automatiquement au moyen d'un pH-stat Radiometer réglé à pH 9.0 et délivrant de la soude 0.02 N. On enregistre d'abord durant 2 min la faible consommation de soude qui se manifeste spontanément en l'absence d'enzyme. On ajoute l'enzyme dans un volume de 20–300 μl et on poursuit l'enregistrement durant 1–2 min. La vitesse de la réaction, exprimée en unités-lipase (μéquivalents acide/min) se déduit directement de la différence de pente des deux droites inscrites par l'appareil.

Préparation des émulsions

Le but essentiel des opérations décrites sous cette rubrique est d'obtenir des émulsions stables dont les particules aient des diamètres aussi voisins que possible. Ces diamètres doivent néanmoins varier d'une émulsion à l'autre et être susceptibles d'être mesurés dans de bonnes conditions par centrifugation ou comptage électronique (voir plus loin). On arrive à satisfaire ces diverses conditions en soumettant les émulsions à une série de fractionnements par centrifugation. Les centrifugations agissent en quelque sorte comme un tamis, c'est à dire qu'elles classent les particules par ordre de taille. La plupart des détails expérimentaux sont dictés par l'empirisme. D'une façon générale, on verse 60 g d'huile dans 200 ml d'une solution à 1.2% de sels biliaires qui permet d'obtenir une répartition correcte des tailles des particules avec l'appareillage utilisé. On émulsifie durant 3 min (émulsions à grosses particules) ou durant 6 min (émulsion à fines particules) dans un mixer à lames tournantes

* L'expression "sels biliaires" désigne la préparation suivante: De la bile de bœuf (1000 g) est évaporée au bain-marie avec du charbon actif (100 g). Le résidu sec est pulvérisé et épuisé 3–4 fois par de l'éthanol absolu (1000 ml) à reflux. Les extraits filtrés et évaporés laissent un liquide visqueux qui est précipité par 15 fois son volume d'oxyde d'éthyle anhydre. Le précipité est lavé à plusieurs reprises par l'oxyde d'éthyle et séché sous vide. Une chromatographie en couche mince[4] révèle la présence, en proportions d'ailleurs variables, d'acides taurocholique, taurodésoxycholique, glycocholique et glycodésoxycholique, ainsi que de traces d'acide cholique.

** Une solution-stock de désoxycholate de sodium $3.06 \cdot 10^{-2}$ M est préparée en dissolvant de l'acide désoxycholique dans NaOH 0.5 M et en ramenant le pH à 9.0 par addition d'HCl 1 M sous forte agitation. Cette solution évolue avec le temps, par suite vraisemblablement de la formation de micelles. Elle doit être préparée au moins 24 h à l'avance, faute de quoi les cinétiques présentent des périodes de latence et la reproductibilité des mesures n'est pas bonne.

en évitant que la température s'élève. On centrifuge dans des champs d'intensité donnée. On trouve les particules les plus grosses dans la crème montant à la surface, les particules les plus fines dans le liquide inférieur et les particules de taille moyenne dans une couche intermédiaire souvent d'ailleurs mal définie. Les fractions sont observées sous le microscope afin d'obtenir une première idée des dimensions des particules qu'elles renferment, puis elles sont soumises à de nouvelles centrifugations dans le désoxycholate $3.06 \cdot 10^{-2}$ M jusqu'à ce que les dimensions tombent entre les limites désirées. Les émulsions utilisées sont ainsi faites dans le désoxycholate $3.06 \cdot 10^{-2}$ M.

Mesure de l'aire de l'interface dans une émulsion de triglycérides

La surface totale (S) des particules supposées sphériques d'une émulsion peut être calculée dès que l'on connaît le diamètre moyen (d) des globules et le volume (A_2) de la phase émulsifiée:

$$S = \frac{6 A_2}{d} \tag{1}$$

Le diamètre moyen (d) est lui même relié au nombre (n) des particules par la formule:

$$n = \frac{6 A_2}{\pi d^3} \tag{2}$$

L'observation des émulsions sous le microscope permet, au moins en principe, de connaître (n) par dénombrement des particules dans un volume donné et (d) par étude statistique des diamètres à l'aide d'un micromètre. Malgré bien des efforts, cette méthode, pourtant préconisée par d'autres auteurs[3], ne nous a pas paru capable de fournir le degré de précision et de reproductivilité requis par des mesures vraiment quantitatives. Les erreurs commises sont surtout sérieuses dans le domaine des particules fines auxquelles correspond parfois une fraction importante de la surface totale. Bref, la méthode a été utilisée, ainsi que nous l'indiquons plus haut, comme guide durant le fractionnement préalable des émulsions. Mais, pour les mesures proprement dites de surface, nous avons fait appel à la centrifugation dans un gradient de saccharose et au comptage électronique des particules.

Centrifugation dans un gradient de saccharose. Cette technique est couramment utilisée pour le fractionnement de diverses macromolécules (acides nucléiques et protéines) en fonction de leurs poids. PINTER ET ZILVERSMIT[5] ont montré qu'elle permet également de fractionner des particules émulsifiées qui migrent dans le gradient d'autant plus loin que leur diamètre est plus grand. Les particules se classent donc en une série de populations ayant des diamètres analogues. On détermine alors la quantité de phase émulsifiée présente dans chaque population et on en déduit la surface totale. Nous donnons ci-dessous un exemple d'application de la technique à nos émulsions fines (diamètre maximum des particules, 2 μ environ).

Après quelques essais d'orientation, le protocole expérimental suivant a été adopté. Au fond d'un tube de 29 ml pour rotor S W 25 d'une centrifugeuse Spinco modèle L, on dépose 3.6 ml d'une solution à 60% de saccharose colorée au bleu de méthylène. Au dessus de cette première couche qui matérialise clairement le niveau de départ, on laisse écouler à l'aide d'une micropipette 0.1–0.2 ml de saccharose à

50% contenant l'émulsion. Puis, on fait arriver doucement par un tube capillaire la solution de saccharose constituant le gradient. Le gradient, rigoureusement linéaire, est lui même obtenu par mélange de deux solutions à 40 et 30% selon la technique de MARTIN ET AMES[6]. Après centrifugation dans un champ convenable, les quantités de triglycérides présents à divers niveaux du tube sont estimées par la microméthode de VAN HANDEL ET ZILVERSMIT[7]. La zeolite, qui améliore considérablement les conditions de l'extraction de la phase grasse, est broyée et passée à travers un tamis No. 60. Elle est lavée au chloroforme dans une colonne jusqu'à ce que l'effluent ne laisse plus de résidu coloré par évaporation. Elle est enfin séchée et activée à 125° durant 4 h.

La formule donnée par PINTER ET ZILVERSMIT dans leur publication est imprimée de façon inexacte. L'expression correcte que nous avons recalculée est*:

$$d = \left\{ \frac{18}{t\omega^2} \left[\frac{\eta_0 + \beta L_0}{\varrho_p - \varrho_0 - \alpha L_0} \ln \frac{L}{L_0} - \frac{\beta(\varrho_p - \varrho_0) + \alpha\eta_0}{\alpha\varrho_p - (\varrho_0 - \alpha L_0)} \ln \frac{\alpha(L - L_0) + \varrho_p - \varrho_0}{\varrho_p - \varrho_0} \right] \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

Tous les termes de cette formule conservent la même signification que dans l'expression originale. α et β ont des valeurs négatives.

La courbe théorique correspondant à la Formule 3 est donnée par le diagramme de gauche de la Fig. 1, étant entendu que les conditions opératoires (gradient, température, champ centrifuge, durée de la centrifugation etc...) sont celles indiquées

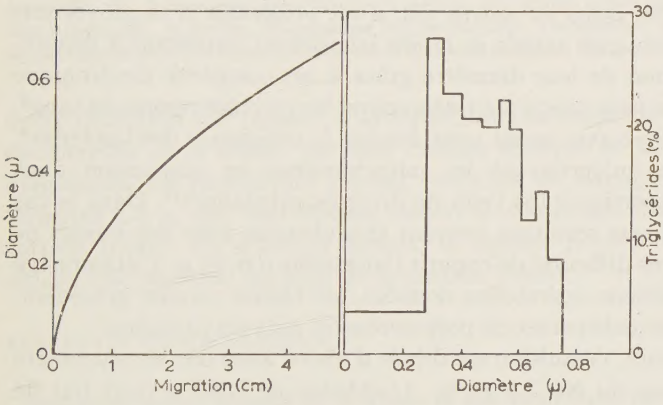

Fig. 1. Etude d'une émulsion de triglycérides par centrifugation dans un gradient de saccharose. La préparation du gradient est décrite dans le texte. Centrifugation de 31 min à 4040 tours/min dans le rotor SW 25 d'un appareil Spinco modèle L maintenu à 23°. La vitesse angulaire est calculée en divisant le nombre de tours accomplis (compteur totaliseur) par le temps mesuré au chronomètre. On règle le frein de l'appareil pour que la période de décellération soit égale à la période d'accélération et on compte pour moitié la somme des deux périodes dans le calcul de la durée totale de la centrifugation. Les périodes en question sont d'ailleurs courtes (de l'ordre de 1–2 min) par rapport à la centrifugation proprement dite à vitesse constante. A gauche, courbe théorique des diamètres en fonction des distances de migration. Les points de cette courbe sont calculés à partir de la Formule 3. A droite, exemple d'application de la technique à la détermination de la surface d'une émulsion. On porte en abscisses les diamètres et, en ordonnées, les quantités de triglycérides (exprimées en % de la quantité totale pour une variation de diamètre de 10^{-1} μ) trouvées dans les diverses fractions. Chaque rectangle matérialise une population de particules possédant approximativement le même diamètre. La surface de chaque population est déterminée et la somme donne la surface totale.

* Nous devons le calcul à l'obligeance de M. DELAAGE.

dans le texte et dans la légende de la figure. L'exactitude de la formule et la validité de l'ensemble des opérations ont été contrôlées au moyen d'émulsions étalon de polystyrène et de polyvinyltoluène aimablement fournies par la Dow Chemical Corporation et couvrant l'intervalle 0.264–2.05 μ. La sensibilité de la technique de centrifugation est telle qu'on a pu montrer que l'une des émulsions supposée monodisperse (valeur indiquée du diamètre des particules, 1.30 μ) donnait en fait naissance à deux bandes distinctes et qu'elle renfermait par conséquent deux populations (diamètres respectifs, 1.15 et 1.40 μ). Les autres émulsions, par contre, étaient réellement monodisperses et les valeurs trouvées expérimentalement pour les diamètres de leurs particules correspondaient aux indications du fournisseur.

Les conditions opératoires étant fixées, la technique n'est évidemment utilisable que dans un domaine déterminé et relativement étroit. A la fin de chaque centrifugation, les plus petites particules restent en effet rassemblées de façon indistincte dans la zone inférieure, tandis que les plus grosses ont déjà atteint le haut du tube. Dans l'exemple concret du diagramme de droite de la Fig. 1, les limites sont 0.25 et 0.75 μ. Le fractionnement préalable de l'émulsion a d'ailleurs été réglé pour que cette condition soit à peu près satisfaite. Le nombre de particules supérieures à 0.75 μ ou inférieures à 0.25 μ est relativement faible. Si la majorité des particules avaient eu une taille différente, il aurait fallu changer les modalités de l'expérience.

Comptage électronique. L'exemple de la Fig. 1 montre que la technique précédente donne de bons résultats dans le cas d'émulsions fines contenant des particules de taille à peu près uniforme. Dans les autres cas, il est préférable d'employer une technique différente, d'ailleurs plus rapide et moins laborieuse, consistant à dénombrer les particules en fonction de leur diamètre grâce à un compteur électronique Coulter modèle A*. Primitivement conçu pour dénombrer les globules rouges du sang[8], cet appareil a déjà été employé avec profit pour étudier la croissance des bactéries[9], les modifications de forme qu'éprouvent les mitochondries en suspension dans différents milieux[10] et la dispersion dans l'eau de diverses substances[11]. Dans le cas qui nous occupe ici, d'excellents résultats peuvent être obtenus avec des sondes de 30 et 70 μ qui permettent sans difficulté de couvrir l'intervalle 0.6–15 μ. L'étalonnage de l'appareil, pour des conditions opératoires données, est réalisé comme précédemment à l'aide d'émulsions monodisperses de polystyrène et polyvinyltoluène.

Au moment de la mesure, l'émulsion est diluée d'abord avec du désoxycholate de sodium à 1.25% puis avec du NaCl à 1.2%. L'addition de NaCl a pour but de porter la conductivité du système à la valeur voulue. Les solutions doivent être exemptes de poussières. On les prépare avec de l'eau fraîchement bidistillée et conservée dans des récipients fermés. La solution à 1.2% de NaCl est en outre préparée à partir d'une solution à 25% filtrée plusieurs fois sur Millipore de 100 mμ. On peut vérifier expérimentalement que les émulsions stock sont stables durant plus de 4 jours. La Fig. 2 donne un exemple de comptage des particules dans une émulsion de triglycérides. Les résultats de l'expérience y sont exprimés de deux façons différentes. A gauche, le diagramme fournit une indication directe sur la fréquence des particules en fonction de leur diamètre. Pour tracer le diagramme de droite, appelé diagramme log-probabilité[12,13], on fixe à 100 la surface totale estimée des particules. Puis, on calcule en pourcentages les surfaces correspondant aux particules dont le

* Coultronics France, 53 rue de la Station, Franconville (S. & O.).

diamètre est supérieur à une valeur donnée. Lorsqu'on se trouve en présence d'une dispersion ou d'une émulsion dont la répartition est "log-normale", le diagramme log-probabilité de droite est linéaire . Le diagramme de gauche est une courbe de Gauss.

L'examen de la Fig. 2 montre que l'émulsion étudiée est à peu près log-normale, sauf dans la région des particules fines (1–3 μ) dont le nombre est un peu trop élevé.

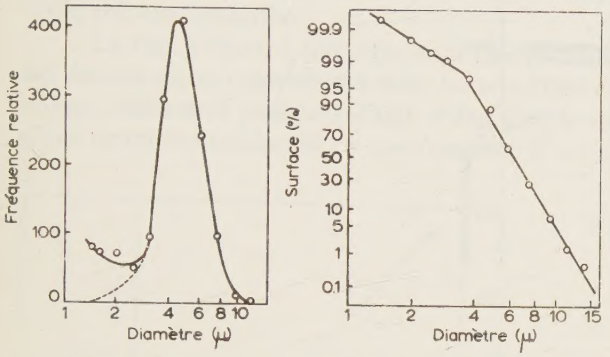

Fig. 2. Etude d'une émulsion de triglycérides par comptage électronique des particules en fonction de leur diamètre. Les conditions générales des mesures et la signification des diagrammes sont indiquées dans le texte. A gauche, fréquence des particules en fonction de leur diamètre. L'échelle des fréquences est linéaire et utilise des unités arbitraires. L'échelle des diamètres est logarithmique. A droite, diagramme log-probabilité. Ordonnées, surface (% de la surface totale) appartenant aux particules supérieures à une dimension donnée. Echelle, probabilité (%).

Cette déviation par rapport à la répartition théorique se manifeste à gauche par un épaulement et, à droite, par une cassure brusque de la représentation linéaire. Le diagramme log-probabilité permet toutefois de s'apercevoir que les particules inférieures à 1 μ, qui sont omises durant le comptage, n'apportent que 0.05% de la surface totale. En d'autres termes, la mesure possède un haut degré de sécurité puisqu'elle intéresse 99.95% de la surface totale.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Corrélation entre l'activité de la lipase et son adsorption par la phase émulsifiée

Nous avons rappelé dans l'introduction que la lipase pancréatique hydrolyse préférentiellement les esters émulsifiés et que son activité augmente avec la quantité de phase émulsifiée. Le fait que cette phase se présente dans un état insoluble fournit un moyen simple de montrer expérimentalement l'existence d'une corrélation entre la vitesse de la réaction et l'adsorption de l'enzyme par son substrat. L'expérience consiste à ajouter la même quantité de lipase à diverses émulsions contenant des quantités variables de phase émulsifiée*. Une partie de chaque mélange sert à la

* Cette expression "quantité de phase émulsifiée" n'a pas actuellement de signification précise. Son rôle, d'ailleurs provisoire, est de fournir une échelle relative de valeurs exprimées en unités arbitraires et permettant de tracer des courbes. C'est ainsi par exemple que des "quantités" d'émulsion égales à 1, 2 ou 3 indiquent que, dans les expériences considérées, les volumes utilisés d'une même émulsion-stock étaient entre eux comme 1, 2 et 3. Le but du travail est justement de découvrir la signification exacte de cette notion de "quantité".

détermination habituelle de la vitesse d'hydrolyse à pH 9.0 et 37°. L'autre partie est centrifugée à 4°. La phase aqueuse limpide est soutirée et sa teneur en lipase est mesurée par la technique habituelle. La lipase ne subissant aucune inactivation durant les opérations, la différence entre la quantité totale ajoutée à l'émulsion et celle restant dans la phase aqueuse donne la quantité adsorbée. La Fig. 3 reproduit une courbe d'activité à pH 9.0 et deux courbes d'adsorption à pH 5.0 et 9.0.

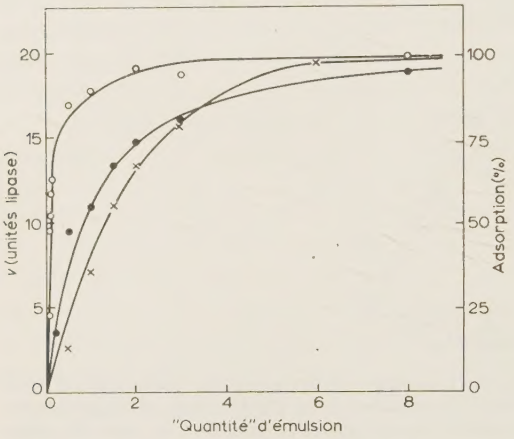

Fig. 3. Courbes d'activité et d'adsorption de la lipase en fonction de la quantité de phase émulsifiée. Au moment où ces essais ont été réalisés, nos émulsions étaient encore stabilisées, selon la technique ancienne, par la gomme arabique. On s'est contenté de sélectionner les particules moyennes par deux centrifugations, l'une à 550 × *g* durant 10 min éliminant les particules les plus grosses et l'autre à 8500 × *g* durant25 min éliminant les particules les plus fines. Les particules moyennes formant une crème à l'issue de la 2ème centrifugation sont reprises dans la gomme arabique à 6% et constituent ce qu'on appelle ici l'émulsion-stock. A des volumes variables de cette émulsion, on ajoute 0.4 ml de tampon (Tris 0.1 M pour les essais à pH 9.0; acétate 0.05 M pour les essais à pH 5.0), la quantité optimum de sels biliaires sous la forme d'une solution à 6.6%, assez d'eau pour porter le volume à 11 ml et finalement 1 ml d'une solution de lipase contenant 19.7 unités. Les centrifugations et les mélanges sont faits à 0° afin de ralentir l'action de la lipase sur son substrat à pH 9.0. On indique dans le texte qu'une partie des mélanges est utilisée pour les déterminations d'activité à pH 9.0 et 37°. L'autre partie est centrifugée à 105 000 × *g* durant 15 min dans un appareil Spinco modèle L. On perce le fond des tubes avec une aiguille et on laisse écouler lentement environ 7 ml du liquide limpide sous-jacent dont on détermine la teneur en lipase. ×—×, vitesse initiale de la réaction exprimée en unités-lipase (ordonnées de gauche). ○--○, ●—●, adsorption de la lipase (%) à pH 5.0 et pH 9.0, respectivement (ordonnées de droite). Afin de faciliter la comparaison, l'ordonnée 100 de droite (adsorption totale) est au même niveau que l'ordonnée 19.7 de gauche (activité maximum).

En dépit de toutes les difficultés d'ordre expérimental rencontrées au cours des mesures, la Fig. 3 montre clairement qu'il existe à pH 9.0 une excellente corrélation entre l'activité de la lipase et son adsorption par la phase émulsifiée. Cette corrélation maintenant démontrée sur le plan expérimental, confirme bien nos hypothèses antérieures[1] rappelées dans l'introduction. L'étape primaire de la catalyse lipasique est l'adsorption de l'enzyme par son substrat émulsifié et les courbes de Michaelis obtenues en phase hétérogène traduisent cette adsorption.

La Fig. 3 nous apprend également que la lipase est adsorbée de façon plus intense à pH 5.0 où elle est inactive qu'à pH 9.0 où elle manifeste sa pleine activité. On sait que d'autres estérases sont capables, à des pH où elles ne sont pas actives, de contracter avec leur substrat des interactions engendrant des dérivés acylés stables[14].

Etude cinétique de l'action de la lipase en milieu hétérogène

Le problème consiste maintenant à trouver une expression rationnelle de la quantité de substrat émulsifié dont nous venons de rappeler l'influence sur la vitesse de la lipolyse. La grandeur choisie pour exprimer cette quantité doit nous permettre de déterminer sans ambiguité les deux paramètres cinétiques V_m et K_m de la réaction, au moyen par exemple de la représentation classique de Lineweaver–Burk. Mais la première condition est que la représentation soit linéaire afin d'obtenir la valeur $1/K_m$ par extrapolation.

La Fig. 4 montre que cette condition préalable est satisfaite lorsqu'on emploie des émulsions de triglycérides dans les sels biliaires*. Les abscisses de la figure sont encore arbitraires puisqu'il s'agit d'une simple expérience d'orientation. On part d'une certaine émulsion-stock que l'on dilue à volonté par la solution désoxycholate–

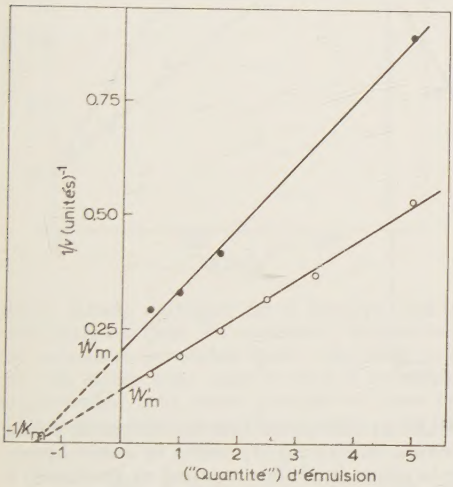

Fig. 4. Etude cinétique de la lipolyse. Cas d'une même émulsion hydrolysée pour deux quantités différentes de lipase. Ordonnées, valeurs inverses de la vitesse initiale (v) exprimée en unités de lipase. Abscisses, valeurs inverses de la quantité d'émulsion exprimées en unités arbitraires. Les deux expériences sont faites avec 3.5 (●—●) et 6.5 (○—○) unités-lipase. Le mélange réactionnel, dont le volume total est 40 ml, contient de 10 à 100 μl d'une même émulsion-stock. Les deux droites sont tracées par la méthode des moindres carrés.

NaCl–$CaCl_2$ et on fait agir sur chaque dilution deux quantités différentes de lipase. Il est aisé de constater que les deux séries de points obtenus s'alignent le long de deux droites. Les deux vitesses maximum V_m et V'_m sont, comme il se doit, proportionnelles aux quantités de lipase employées. En outre, les extrapolations des droites se rencontrent presqu'exactement sur l'axe des abscisses. Une valeur certainement significative de K_m peut donc être obtenue. Mais nous sommes encore incapables d'exprimer cette valeur de façon rationnelle puisque les abscisses du diagramme sont arbitraires.

Le diagramme de la Fig. 4 justifie en quelque sorte l'emploi de notre système

* Les représentations selon Lineweaver–Burk ne sont pas linéaires avec des émulsions de triglycérides dans la gomme arabique. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle nous les avons remplacées par des émulsions dans les sels biliaires.

d'émulsion et il nous incite à examiner de plus près le cas de deux émulsions différentes sur lesquelles on fait agir la même quantité de lipase. Cette étude fait l'objet de la Fig. 5.

L'examen des diagrammes de la Fig. 5 suggère quelques remarques intéressantes. Lorsque la quantité d'émulsion est exprimée par le poids de la phase émulsifiée (diagramme de gauche), les points expérimentaux relatifs aux deux émulsions s'alignent le long de deux droites distinctes. Le point de concours de ces droites est situé sur l'axe des ordonnées. Il y a donc une seule valeur de V_m, ce qui est normal puisque la même quantité de lipase est utilisée dans les deux cas. Mais, deux valeurs de K_m sont obtenues, ce qui est anormal et montre que ,dans le cas particulier des substrats émulsifiés, le poids du substrat ne doit pas être retenu. Pour chaque point

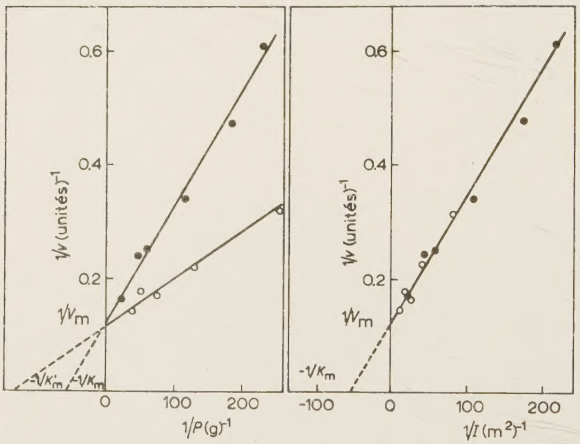

Fig. 5. Etude cinétique de la lipolyse. Cas de deux émulsions différentes hydrolysées par la même quantité de lipase. Ordonnées, valeurs inverses de la vitesse initiale (v) exprimées en unités-lipase. Abscisses: à gauche, valeurs inverses du poids (P) de la phase émulsifiée exprimé en grammes; à droite, valeurs inverses de l'aire de l'interface (I) exprimée en m². Dans chaque essai, il y a 4.4 unités-lipase. Le volume total est 40 ml. ●—●, émulsion contenant de grosses particules (0.954 m² d'interface par gramme de triglycérides). ○—○, émulsion contenant des particules fines (2.87 m² d'interface par gramme de triglycérides). Les aires portées en abscisses du diagramme de droite sont déterminées par l'une des deux techniques (centrifugation et comptage électronique) décrites dans le chapitre précédent.

de l'axe des abscisses, sauf, comme nous venons de le dire, à l'origine, la vitesse initiale de la lipolyse est d'autant plus grande que le substrat est plus finement émulsifié. Ce fait constitue vraisemblablement la caractéristique essentielle des processus enzymatiques se déroulant au sein d'un milieu hétérogène. Il suggère que l'aire de l'interface, et non le poids du substrat, régit alors la vitesse de la réaction.

Le diagramme de droite de la Fig. 5, montre effectivement qu'en portant en abscisses les aires (I) de l'interface au lieu des poids de substrat, les deux séries de points expérimentaux se groupent autour d'une même droite fournissant une valeur unique, non seulement pour V_m, mais aussi pour K_m. K_m devient ainsi indépendant de la plus ou moins grande finesse de l'émulsion.

Les essais décrits jusqu'ici étant uniformément réalisés dans un volume de 40 ml, l'influence éventuelle de ce volume sur la vitesse de la lipolyse reste encore à déterminer. L'expérience qualitative suivante montre tout de suite que cette in-

fluence existe réellement. On attaque une émulsion de triglycérides dans les conditions habituelles par une quantité donnée de lipase et on inscrit la cinétique de la réaction au pH-stat. Au bout d'environ 1 min, on dilue le mélange par addition d'un certain volume de phase aqueuse portée au préalable à 37° et pH 9.0 et contenant du désoxycholate, NaCl et $CaCl_2$. On constate alors un brusque changement de pente, trahissant une baisse de vitesse et, par conséquent, le passage dans la phase aqueuse d'une certaine portion de la lipase adsorbée. La Fig. 6 donne les résultats d'une étude plus systématique de ce phénomène.

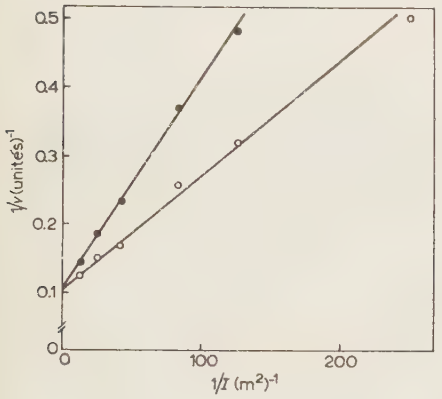

Fig. 6. Etude cinétique de la lipolyse. Influence du volume total de l'émulsion. Les lipolyses sont réalisées dans les conditions habituelles. Ordonnées, valeurs inverses des vitesses initiales (v) exprimées en unités-lipase. Abscisses, valeurs inverses de l'aire interfaciale (I) exprimée en m^2. On utilise pour chaque essai la même émulsion-stock (0.954 m^2 d'interface par gramme de triglycérides) et la même quantité de lipase (5.8 unités). Le volume final de l'émulsion au moment des mesures est 13.3 ml (○—○) ou 40 ml (●—●).

La Fig. 6 montre en effet que, pour une quantité de lipase et une aire interfaciale déterminées, les vitesses de lipolyse, à l'exception encore de la vitesse maximum V_m, sont plus petites lorsque le volume de l'émulsion est plus grand. Puisque l'augmentation de volume de la phase aqueuse réduit, toutes autres choses restant égales, le nombre de molécules de lipase adsorbées, on doit évidemment penser que l'adsorption de l'enzyme à l'interface triglycérides-eau est réversible.

Dans l'état actuel de l'expérimentation, il semble d'ailleurs que l'action de la lipase à l'interface puisse être décrite par le système classique de l'état stationnaire*.

$$E(\text{solution}) + S(\text{émulsion}) \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES(\text{émulsion}) \xrightarrow{k_3} \text{Produits} \qquad (4)$$

Soit A_0 le volume total de l'émulsion, A_1 le volume de la phase aqueuse, A_2 le volume de la phase grasse de l'émulsion, E_0 l'enzyme total dont E_1 est libre et E_2 est adsorbé, I l'interface dont λE_2 est occupée par l'enzyme, l'état stationnaire correspond à

$$k_1 E_1 (I - \lambda E_2)/A_1 = (k_2 + k_3)\,\lambda E_2 \qquad (5)$$

* Le calcul qui suit a été fait par le Dr. M. LAZDUNSKI.

Si l'on admet que λE_2 et A_2 sont faibles par rapport à I et A_0, respectivement, il vient:

$$k_1 (E_0 - E_2) I/A_0 = (k_2 + k_3) \lambda E_2$$

d'où, en posant

$$K = \frac{k_1}{\lambda (k_2 + k_3)}$$

$$E_2 = \frac{E_0 (I/A_0)}{1/K + I/A_0}$$

$$v = k_3 E_2 = \frac{k_3 E_0 (I/A_0)}{1/K + I/A_0} \qquad (6)$$

Dans l'Equation 4, qui a la forme d'une équation de Michaelis, I/A_0, c'est à dire l'aire de l'interface par unité de volume d'émulsion, tient lieu de la notion ordinaire de concentration de substrat. Nous proposons d'appeler cette grandeur "concentration d'interface". En outre

$$K_m = \frac{1}{K} = \frac{\lambda (k_2 + k_3)}{k_1}$$

et

$$V_m = k_3 E_0$$

L'Equation 5 peut se transformer en

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k_3 E_0} \left[\frac{1}{K} \left(\frac{A_0}{I} \right) + 1 \right]$$

Sa validité repose donc sur la proportionnalité qui doit exister entre $1/v$ et A_0/I. Nous savons déjà par la Fig. 5 que $1/v$ est proportionnel à $1/I$. Il nous reste donc

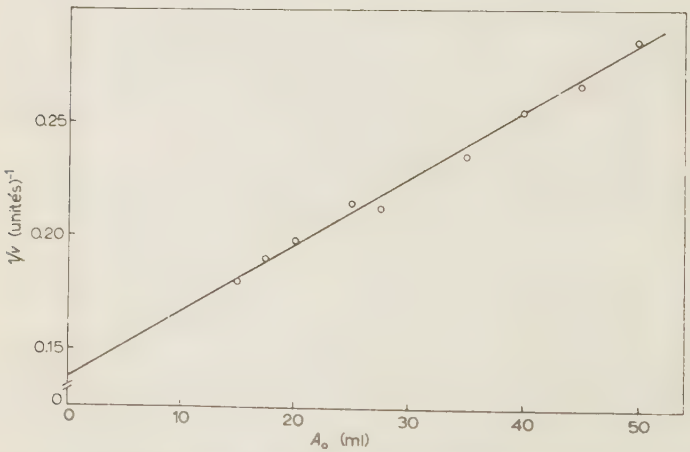

Fig. 7. Relation linéaire entre l'inverse de la vitesse initiale et le volume total de l'émulsion. Abscisses, volume total (A_0) de l'émulsion (ml). Ordonnées, valeur inverse de la vitesse initiale (v) exprimée en unités-lipase. Les grandeurs E_0 et I, qui sont constantes dans tous les essais, sont respectivement égales à 4.6 unités-lipase et 160 cm².

à démontrer expérimentalement que $1/v$ est proportionnel à A_0, c'est à dire au volume total de l'émulsion. La Fig. 7 nous indique qu'il en est bien ainsi.

Lorsque k_3 est petit vis à vis de k_2, le système (4) se réduit à l'équilibre de Langmuir:

$$E(\text{solution}) + S(\text{émulsion}) \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} (ES)\ \text{émulsion}$$

qui décrit à la fois l'adsorption réversible de la lipase à l'interface et l'action catalytique de l'enzyme sur son substrat émulsifié.

DISCUSSION

SCHØNHEYDER ET VOLQVARTZ[3] ont déjà tenté de démontrer que l'activité de la lipase sur un substrat émulsifié dépend des dimensions de l'interface, en utilisant la tricaproine (trihexanoyl glycérol) comme substrat et en évaluant les surfaces par observation microscopique des émulsions. La tricaproine possède une solubilité notable dans l'eau (4.6 mg/l). Les auteurs ont donc été amenés à fonder leur démonstration sur l'étude du partage de l'enzyme entre la phase aqueuse, où il est censé agir sur la tricaproine dissoute, et une interface variable. De toute évidence, la valeur de la démonstration de SCHØNHEYDER ET VOLQVARTZ est considérablement affaiblie par le fait que leur préparation de lipase n'était pas purifiée et qu'elle contenait par conséquent l'activité "estérase" du pancréas[1]. La tricaproine dissoute était donc hydrolysée dans leurs expériences, non seulement par la lipase, mais aussi, et sans doute de façon prédominante, par "l'estérase".

Dans le présent travail, nous avons utilisé des triglycérides à longues chaînes dont la solubilité dans l'eau est négligeable. Il n'était donc pas question d'étudier un "partage" éventuel de l'activité de la lipase. Notre approche expérimentale a été d'utiliser deux émulsions de finesse différente. Le problème essentiel était alors de savoir déterminer avec précision l'aire de l'interface des émulsions. Nous avons donc abandonné la technique d'observation microscopique dont les résultats nous paraissaient douteux, et nous avons eu recours à deux techniques apparemment plus satisfaisantes: la centrifugation des émulsions dans un gradient de saccharose et le comptage électronique des particules.

L'autre décision ayant influencé favorablement la suite du travail a été d'abandonner les anciennes émulsions dans la gomme arabique pour les remplacer par des émulsions dans les sels biliaires qui donnent des représentations de Lineweaver–Burk parfaitement rectilignes.

Les résultats présentés fournissent quelques renseignements nouveaux sur l'étape primaire du processus de lipolyse des triglycérides émulsifiés et ils donnent l'espoir de mieux comprendre à l'avenir les modalités de la catalyse enzymatique en milieu hétérogène. La lipase, dont la solubilité dans l'eau est connue, possède, en présence de sels biliaires, la propriété de s'adsorber de façon réversible aux interfaces apolaires triglycérides-eau pour y former une couche vraisemblablement monomoléculaire répondant aux critères de Langmuir*. Pour retrouver le traitement

* Au moment de simplifier la Formule 5 pour obtenir la Formule 6 nous avons admis que le volume (A_2) de la phase grasse et la surface (λE_2) occupée par l'enzyme à l'interface étaient faibles par rapport, respectivement, au volume total (A_0) de l'émulsion et à la surface totale (I)

cinétique classique des réactions enzymatiques, il suffit de considérer que: (a) le nombre des molécules du complexe ES, lequel détermine dans des conditions opératoires données la vitesse initiale de la réaction, est égal au nombre de molécules de lipase adsorbées à l'interface; (b) la notion de concentration pondérale ou molaire du substrat, qui perd son sens habituel dès que le substrat est insoluble, doit être remplacée par la "concentration d'interface", c'est à dire l'aire de l'interface dans l'unité de volume d'émulsion. Les représentations de Lineweaver–Burk deviennent alors indépendantes de la finesse et du volume de l'émulsion. Elles permettent de définir un K_m (émulsion) de la lipase, lui-même exprimé en concentration d'interface.

Il faut d'ailleurs noter à nouveau, ainsi que nous l'avons déjà fait plus haut et dans une publication précédente[1], que le K_m (émulsion) de la lipase contient, non seulement les constantes de vitesse k_2 et k_3, mais aussi un paramètre λ qui rend vraisemblablement compte de l'état d'organisation des molécules de la couche interfaciale. L'importance éventuelle de ce dernier terme ne s'est pas manifestée au cours de nos expériences, puisque les émulsions utilisées étaient toutes préparées dans les mêmes conditions, avec les mêmes triglycérides et en présence du même émulsifiant. Le K_m était donc une constante bien définie. Il aurait pu en être autrement si les conditions avaient été différentes. Cette remarque revêt une importance particulière dans l'interprétation des phénomènes d'activation et d'inhibition de la lipase.

Le fait d'avoir pris pour variable unique l'aire de l'interface dans l'unité de volume d'émulsion ne doit pas d'autre part nous inciter à négliger l'existence éventuelle d'autres variables significatives telles que la charge des particules émulsionnées qui est capable de modifier la constante de vitesse k_1. On connaît l'influence considérable exercée par cette charge durant l'hydrolyse des phospholipides par les phospholipases[16–18]. La charge des particules de triglycérides dépend vraisemblablement de la nature de l'émulsifiant et de la force ionique de la phase aqueuse. Il est sans doute intéressant de rappeler à cet égard que la lipase ne devient capable d'hydrolyser les émulsions de triglycérides dans les sels biliaires qu'en présence d'une concentration relativement élevée de NaCl. En l'absence de NaCl, la vitesse est extrêmement faible et les cinétiques ne sont pas linéaires.

L'importance essentielle pour tout ce qui précède de la réversibilité de l'adsorption interfaciale de la lipase mérite enfin d'être soulignée. Si l'adsorption de l'enzyme n'était pas réversible, les représentations de Lineweaver–Burk ne seraient pas linéaires et le traitement cinétique de l'action lipasique en termes d'état stationnaire ou d'isothermes de Langmuir ne serait naturellement pas possible. Il est alors

---

de l'interface. Ces deux hypothèses sont faciles à justifier. D'une part, dans aucune de nos expériences, A_2 ne dépasse 0.4% de A_0. D'autre part, si l'on admet que la molécule de lipase est à peu près sphérique et que son poids est de l'ordre de 38 000 (réf. 15), on peut considérer que son diamètre est approximativement de 50 Å et que chaque molécule occupe à l'interface une surface de $2 \cdot 10^{-13}$ cm². Prenons alors un exemple démonstratif où A_0 est faible (40 cm²) et E_0 est fort (5.9 unités). Si l'on fixe à 7000 l'activité spécifique de la lipase pure[11], 5.9 unités représentent $\frac{5.9}{7} \times 10^{-6}$ g ou $\frac{6.02 \times 5.9}{38 \times 7} 10^{14}$ molécules. L'enzyme occupe donc au maximum 2.7 cm², soit 7% de la surface totale. Toutefois, dans le cas précis faisant l'objet de cette étude, la lipase n'est adsorbée qu'à concurrence de 17%. Elle n'occupe donc que 1% de la surface, ce qui est évidemment négligeable. L'expression simplifiée (6) est donc parfaitement valable. SCHØNHEYDER ET VOLQVARTZ[3] ont émis l'opinion que l'adsorption de la lipase était décrite par un isotherme de Freundlich, le coefficient (n) étant pris égal à 1. Nous trouvons au contraire une bien meilleure corrélation avec l'isotherme de Langmuir. En tout état de cause, le coefficient empirique (n) de Freundlich paraît ici être égal à 3.

intéressant que les sels biliaires, dont on vient de constater l'effet sur la réversibilité, soient justement les composés tensioactifs présents dans l'intestin durant la lipolyse in vivo. On peut penser que l'influence exercée par les sels biliaires sur la phase intraluminaire de la digestion des triglycérides est due, au moins en partie, à cette remarquable propriété.

RÉSUMÉ

Le but du présent travail est d'étudier l'action de la lipase pancréatique sur des triglycérides émulsifiés. Cette action fournit un exemple intéressant d'une catalyse enzymatique se déroulant en milieu hétérogène. On montre que:

1. Le substrat émulsifié adsorbe la lipase et la vitesse initiale (v) de la réaction de lipolyse dépend du nombre de molécules d'enzyme adsorbées.

2. En faisant agir la lipase sur des émulsions plus ou moins diluées de triglycérides dans les sels biliaires en présence de NaCl 0.1 M, on obtient des représentations de Lineweaver–Burk rectilignes capables de fournir sans ambiguité la valeur des deux paramètres V_m et K_m de la réaction de lipolyse. Les abscisses de la représentation et ,par conséquent les valeurs de K_m, restent néanmoins indéterminées aussi longtemps que l'on ignore par quoi remplacer dans le cas présent la notion de concentration du substrat. Cette notion perd évidemment son sens lorsque le substrat est insoluble.

3. En utilisant deux émulsions de finesse différente, on s'aperçoit que (v) ne dépend pas directement du poids du substrat insoluble. Pour un même poids, la même quantité d'enzyme et des conditions opératoires données, (v) est d'autant plus grand que l'émulsion est plus fine. v dépend de l'aire (I) de l'interface. I peut être mesurée expérimentalement de façon précise au moyen de deux techniques, la centrifugation des émulsions dans un gradient de saccharose et le comptage électronique des particules en fonction de leur diamètre par un appareil Coulter.

4. v étant d'autre part inversement proportionnel au volume (A_0) de l'émulsion, l'adsorption de la lipase peut, au moins dans les conditions adoptées, être considérée comme réversible et répondant aux conceptions de Langmuir. La "concentration d'interface" (I/A_0), c'est à dire l'aire de l'interface dans l'unité de volume d'émulsion, joue donc ici le rôle habituellement dévolu à la concentration du substrat. Elle permet de quantifier le K_m (émulsion) de la lipase. La présente étude n'exclut naturellement pas la possibilité que (I/A_0) ne soit pas la seule variable significative. D'autres variables telles que la charge électrique des particules émulsifiées et l'organisation des molécules à l'interface jouent aussi peut-être un rôle dans l'action lipasique.

5. Il est concevable que l'influence bien connue des sels biliaires durant la phase intraluminaire de la digestion des triglycérides est due, en partie tout au moins, au fait que ces substances favorisent la réversibilité de l'absorption interfaciale de la lipase.

REFERENCES

1 L. Sarda et P. Desnuelle, *Biochim. Biophys. Acta*, 30 (1958) 513.
2 G. Benzonana, B. Entressangles, G. Marchis-Mouren, L. Sarda et P. Desnuelle, dans

R. M. C. DAWSON, D. N. RHODES, *Metabolism and Physiological Signicance of lipids*, J. Wiley and sons, London, 1964, p. 141.
3 F. SCHØNHEYDER ET K. VOLQVARTZ, *Acta Physiol. Scand.*, 9 (1945) 57.
4 A. F. HOFMANN, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 127.
5 G. G. PINTER ET D. B. ZILVERSMIT, *Biochim. Biophys. Acta*, 59 (1962) 116.
6 R. G. MARTIN ET B. N. AMES, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 1372.
7 E. VAN HANDEL ET D. B. ZILVERSMIT, *J. Lab. Clin. Med.*, 50 (1957) 152.
8 G. BRECHER, E. F. JAKOBEK, M. A. SCHNEIDERMAN, G. Z. WILLIAMS ET P. J. SCHMIDT, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 99 (1962) 242.
9 K. G. LARK ET C. LARK, *Biochim. Biophys. Acta*, 43 (1960) 520.
10 J. M. GEBICKI ET F. E. HUNTER JR., *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 631.
11 H. E. KUBITSCHEK, *Research London*, 13 (1960) 128.
12 R. R. IRANE, *J. Phys. Chem.*, 63 (1954) 1603.
13 J. G. BRODNYAN, *J. Colloid Sci.*, 15 (1960) 563.
14 A. K. BALLS ET H. N. WOOD, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 245.
15 L. SARDA, M. F. MAYLIÉ, J. ROGER ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 89 (1964) 183.
16 A. D. BANGHAM ET R. M. C. DAWSON, *Biochem. J.*, 75 (1960) 133.
17 A. D. BANGHAM ET R. M. C. DAWSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 59 (1962) 103.
18 R. M. C. DAWSON, *Biochem. J.*, 88 (1963) 414.

Biochim. Biophys. Acta, 105 (1965) 121–136

Cet article recouvre en partie le travail de Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Physiques de G. Benzonana. La soutenance a eu lieu le 3 mai 1967 à la Faculté des Sciences de Marseille et la thèse a été enregistrée au CNRS sous le n° A.O. 1403.